

# 粘虫咽侧体静止激素的初步分离纯化

欧阳迎春, 唐 爽, 关雪辰, 方宇凌

(中国科学院动物研究所, 农业虫鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100080)

**摘要:** 用放射化学的方法, 检测粘虫 *Mythimna separata* 幼虫脑提取物中咽侧体静止激素 (Allatostatin, AS) 样的活性物质。发现粘虫幼虫脑中含有 AS 样的活性物质, 可抑制离体咽侧体 (*Corpora allata*, CA) 的保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 的生物合成。用 1 个脑当量的幼虫脑提取物, 对 CA 的 JH 合成的抑制率达 51%。幼虫脑提取物经胰蛋白酶水解后, AS 活性显著降低, 表明幼虫脑中的活性物质是肽类或蛋白质类物质。

幼虫脑提取物用 Sep-Pak 柱初步纯化, 有活性的组分经高压液相色谱 (HPLC) 分离, 洗脱组分的 AS 活性测定表明, 有 AS 活性的组分主要集中在组分 1~20 和组分 30~60, 其中对离体 CA 的 JH 合成的抑制大于 50% 的组分有 3、5、11、40、54 和 60。

**关键词:** 粘虫; 咽侧体静止激素; 脑提取物; 高压液相色谱

**中图分类号:** Q965 **文献标识码:** A

保幼激素 (Juvenile hormone, JH) 是由咽侧体 (*Corpora allata*, CA) 产生的, 在大多数昆虫中, JH 合成的调节不仅仅是幼虫的生长所需, 而且是成虫的发育所需, 特别是雌成虫的卵黄蛋白的合成。它的合成是受源于脑的神经内分泌细胞分泌的神经肽类激素——咽侧体活化激素 (Allatotropin, AT) 和咽侧体静止激素 (Allatostatin, AS) 调控的, 分别对 CA 的 JH 合成起促进和抑制作用。自 Woodhead 等<sup>[1]</sup>最早从太平洋折翅蠅 *Diploptera punctata* 的脑中分离鉴定出 4 种由 8~13 个氨基酸组成的 AS 以来, 人们利用分离纯化和分子克隆技术, 陆续从太平洋折翅蠅以及其它种类的蜚蠊中分离出一系列相似的 AS<sup>[2]</sup>, 这些 AS 都具有共同的 C-末端序列 Tyr/Phe-Phe-Gly-Leu/Ile-NH<sub>2</sub>。目前已知结构的 AS 主要集中在蜚蠊目昆虫中, 鳞翅目昆虫只从烟草天蛾 *Manduca sexta* 中分离出一种非酰胺化的 AS<sup>[3]</sup>。

本文着重研究粘虫 *Mythimna separata* 幼虫脑中 AS 样的活性物质, 用高压液相色谱 (High-pressure liquid chromatography, HPLC) 技术分离粘虫末龄幼虫脑提取物, 用放射化学的方法测定各分离组分对离体 CA 的 JH 合成的抑制能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 昆虫

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39630050)

收稿日期: 1999-09-24; 修订日期: 1999-12-16

在常规的养虫条件下饲养粘虫，幼虫用人工饲料群体饲养<sup>[4]</sup>，成虫喂 10% 的糖水。

## 1.2 脑粗提物的制备

分批摘取末龄幼虫脑共 900 头，解剖和提取均在 0.9% NaCl 溶液中进行。每组取 50~100 个脑，于 1.5 mL 的 Eppendorf 管中，用 0.9% NaCl 溶液 (10  $\mu$ L/脑) 进行匀浆，匀浆液于沸水浴中煮沸 5 min，5 000 r/min 离心 10 min，取上清液，-80℃ 保存，供进一步纯化用。

## 1.3 脑提取物经 Sep-Pak 柱初步纯化

幼虫的脑提取物经 Sep-Pak 柱初步纯化，具体步骤如下 (流速为 1 mL/h)：(1) 反相 C<sub>18</sub> Sep-Pak 柱的预处理，依次用 5 mL 含 0.1% 三氟乙酸 (TFA) 的 0.1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液，5 mL 含 0.1% TFA 的 17% 乙腈溶液和 5 mL 0.1% TFA 溶液洗柱子；(2) 装填，每个 Sep-Pak 柱装填 250 个脑当量的幼虫脑提取物，重复 3 次；(3) 洗脱，依次用 5 mL 0.1% TFA 溶液，5 mL 含 0.1% TFA 的 17% 乙腈溶液和 3 mL 含 0.1% TFA 的 40% 乙腈溶液，收集含 AS 活性的组分，经 N<sub>2</sub> 流吹去挥发性物质，然后冷冻干燥，-80℃ 保存，供 HPLC 分离。

## 1.4 HPLC 分离

来自上述步骤的相当于 250 个脑当量的含 AS 活性的洗脱组分，用 0.1% TFA 溶液稀释至 250  $\mu$ L，装填到 3.9 mm×150 mm 的反向 C<sub>18</sub> 柱 (填料颗粒 5  $\mu$ m，孔径 90Å，Waters 公司) 上，HPLC 是在自动梯度控制器 Waters 600E 型和 486 型检测器上进行。溶剂 A 为 0.1% TFA 水溶液，溶剂 B 为 0.1% TFA 的 80% 的甲醇溶液，洗脱梯度为 5% 到 95% B 液 60 min，95% B 液 10 min，流速为 1 mL/min，洗脱组分的检测波长为 280 nm。按每分钟收集洗脱组分，然后进行 AS 活性测定。

## 1.5 用于活性测定的各分离组分的储存和制备

经 HPLC 分离的甲醇洗脱组分 (含 0.1% TFA) 储存在 -80° 或立即分析。用于活性测定的组分，取一定量转移到 1.5 mL 含 10  $\mu$ L 0.1% BSA 的离心管中，N<sub>2</sub> 吹干，生测时用 1 mol/L HCl 10  $\mu$ L 重新悬浮，加入适量的培养液，再用 1 mol/L NaOH 中和，进行 CA 的培养。

## 1.6 AS 活性的测定

幼虫脑提取物及经 Sep-Pak 柱和 HPLC 分离所收集的各组分中 AS 样物质的活性测定，采用离体放射化学的方法，即对离体 CA 合成 JH 能力的影响。按 Feyerensen 和 Tobe<sup>[5]</sup>、Tobe 和 Clark<sup>[6]</sup> 的方法并加以改进。JH 合成是以 L-(<sup>3</sup>H-甲基) 蛋氨酸 (比活 200 mci/mmol，NEN 公司) 的掺入来检测的，用异辛烷提取 JH 之前，将 CA 从培养液中移去，合成速率代表释放到培养液中的标记激素。CA 在 50  $\mu$ L 含 <sup>3</sup>H-甲基蛋氨酸 (最终浓度为 50  $\mu$ mol/L) 的 TC199 培养液中培养 3 h 来估计正常的合成速率，然后将 CA 移到含有脑提取物或各分离组分的培养液中再培养 3 h，作为 JH 合成的处理速率，则 JH 合成速率变化的百分比为 (1 - 处理速率/正常速率) × 100%，来表示 CA 被抑制的程度。

## 1.7 胰蛋白酶对脑提取物中 AS 活性物质的影响

幼虫的脑提取物与胰蛋白酶溶液 (0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.8，最终浓度为 1 mg/L) 一起，37℃ 温育 4 h，然后将上述混合液煮沸 20 min，使多余的酶失活，检测 AS 的活性。

2 结果

2.1 末龄幼虫脑提取物抑制 CA 合成 JH 的剂量反应

从图 1 可以看出，末龄幼虫脑中含有 AS 样的活性物质，当培养液中的脑提取物的含量小于 1 个脑当量时，对 CA 合成 JH 的抑制不明显，抑制率在 30% 以下。而在培养液中脑提取物的浓度达到 1 个脑当量时，对 CA 合成 JH 的抑制为 51%，非常显著，再增加脑提取物的浓度，到 5 个脑当量时，抑制率为 61%。

2.2 胰蛋白酶对脑提取物中 AS 活性物质的影响

用胰蛋白酶对末龄幼虫脑提取物进行水解，然后与粘虫成虫 CA 共同培养。从表 1 可以看出，幼虫脑提取物经胰蛋白酶水解后，对 CA 合成 JH 的抑制显著降低，抑制率由原来的 54.5%（5 个脑当量）降为 20%。说明幼虫脑提取物中 AS 样的活性物质对胰蛋白酶是敏感的，即这种活性物质是肽类或蛋白质类的物质。

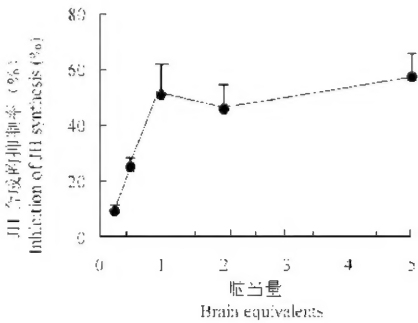


图 1 粘虫幼虫脑提取物对 CA 抑制的剂量反应

Fig.1 Dose-response inhibition of CA activity by extracts of last instar larvae brains from *M. separata*

每个点是 5~8 个重复 Each point is the mean from 5 to 8 replications

表 1 胰蛋白酶对粘虫幼虫脑提取物 AS 活性的影响

处理 Treatment	每对 CA 的 JH 合成速率 (pmol/h) Rate of JH synthesis per pair of CA	抑制率 (%) Inhibition
对照 Control	10.31 ± 1.09 *	
脑提取物 Brain extracts	4.71 ± 0.6 *	54.48 ± 5.82
脑提取物 + 胰蛋白酶 Brain extracts + Trypsin	8.27 ± 0.89 *	19.84 ± 2.65

\* 重复 6 次 (6 replications)

2.3 HPLC 的分离

粘虫幼虫脑提取物用反相 C<sub>18</sub> Sep-Pak 柱初步纯化，经 0.1% TFA 水溶液，0.1% TFA 的 17% 乙腈和 0.1% TFA 的 40% 乙腈依次洗脱，用放射化学的方法进行 AS 活性测定，发现 AS 样的活性物质主要集中在 40% 乙腈溶液中，然后将这部分有 AS 活性的组分进行 HPLC 的分离。

HPLC 的分离用反相 C<sub>18</sub> 柱，甲醇溶液的梯度洗脱，样品分离的色谱图见图 2。

2.4 经 HPLC 分离后各洗脱组分的 AS 活性测定

由图 3 可以看出，经反向 C<sub>18</sub> 柱 HPLC 分离，用相当于 5 个脑当量的洗脱组分，对未交配雌成虫 CA 的活性测定表明，含有 AS 活性的洗脱组分主要集中在组分 1~20，甲醇浓度为

5.2%~28%；组分 30~60，甲醇浓度为 40%~76%。在组分 1~20 中，对 JH 合成的抑制大于 50%的有组分 3、5 和 11，在组分 30~60 中，对 JH 合成的抑制大于 50%的有组分 40、54 和 60。而在组分 20~30，甲醇浓度为 28%~40%中，表现出对 CA 合成 JH 的促进作用，其中组分 22 和 24，能使 CA 合成 JH 的能力提高 60% 以上。

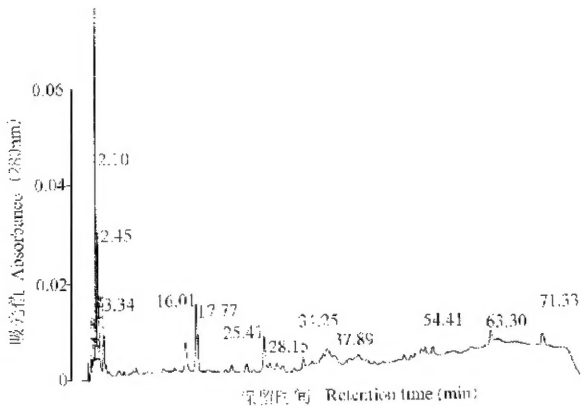


图 2 粘虫幼虫脑提取物经反相 C<sub>18</sub>柱 HPLC 分离的色谱图

Fig.2 Separation of brain extracts of last instar larvae *M. separata* by HPLC with a reverse-phase C<sub>18</sub> column and linear methanol gradient  
进样量为 250  $\mu$ L 含 250 个粘虫幼虫脑当量 Injection with 250 brain equivalents/250  $\mu$ L

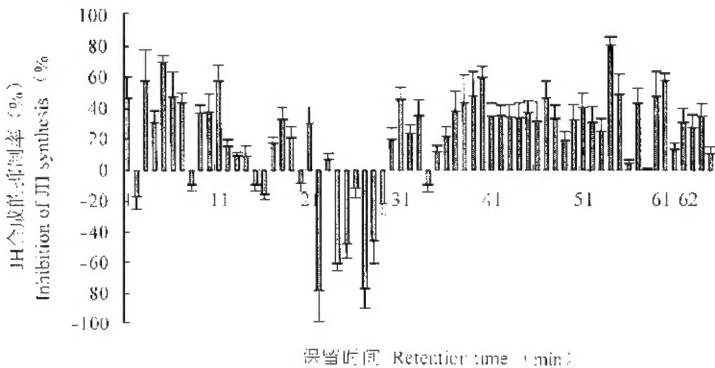


图 3 粘虫幼虫脑经 HPLC 分离后各洗脱组分对 JH 合成的抑制率

Fig.3 Inhibition of JH synthesis by the fractions from HPLC with brain extracts from last instar larvae of *M. separata*

3 讨论

粘虫末龄幼虫脑提取物对 CA 合成 JH 的研究表明，末龄幼虫脑中存在能抑制 CA 合成 JH

的 AS 样的活性物质, 并且对胰蛋白酶敏感, 经胰蛋白酶水解后, AS 样的活性明显降低, 这一点与 Granger 等<sup>[7]</sup>在 *M. sexta* 幼虫脑中发现有 AS 活性的神经肽的结果一致。

来自幼虫脑的提取物经一次 HPLC 分离后, 有 AS 活性的组分主要分布在甲醇浓度为 5.2%~28% (组分 1~20) 和 40%~76% (组分 30~60)。在组分 30~60 中, 对离体 CA 的 JH 合成抑制率大于 50% 的组分有 40、54 和 60, 正好落在已知肽, 促黄体激素释放激素 (Luteinizing hormone-releasing hormone, LHRH) 和生长激素抑制素-14 (Somatostatin-14) 以同样的甲醇梯度, 经 HPLC 分离后的出峰时间范围内, 它们的保留时间分别为 39.6 min 和 54.5 min。Woodhead 等<sup>[1]</sup>在用 HPLC 分离和纯化太平洋折翅蠅的 AS 时, 用已知肽 LHRH 和 Somatostatin-14 作标准来标记含 AS 活性的组分的保留时间。因此我们的结果也证实了这一点。所不同的是在组分 1~20 中也有 AS 的活性物质存在, 其中抑制率大于 50% 的组分有 3、5 和 11, 主要集中在前十几分钟内。而 Woodhead 等分离太平洋折翅蠅的 AS 时, 认为第一次 HPLC 的洗脱组分 1~10 没有 AS 活性, 所以组分 1~10 的 AS 活性没有检测。粘虫幼虫脑提取物经 HPLC 分离, 有高抑制活性的组分须进行下一步的分离纯化, 以期能弄清 AS 的结构。

有趣的是, 幼虫脑提取物经第一次 HPLC 分离, 甲醇浓度在 28%~40% (组分 20~30) 范围内的洗脱组分表现出对 CA 合成 JH 的促进作用。有研究表明, AS 和 AT 可存在于不同种的昆虫中, 如蜚蠊目、鳞翅目和双翅目等<sup>[2]</sup>; 也可在同种昆虫的不同发育阶段存在, 如在 *M. sexta* 中, 已从成虫脑中分离出一种 AT<sup>[8]</sup>, 从被成虫脑中分离出一种 AS<sup>[3]</sup>, 以及在末龄幼虫脑中证明有 AS 活性物质存在<sup>[7]</sup>, 这一点也表明鳞翅目昆虫神经肽类激素对 CA 的调控比较复杂。我们对粘虫幼虫脑的分离, 其分离组分表现出既有 AS 的活性, 又有 AT 的活性, 说明对某些昆虫来说, AS 和 AT 可能同时存在, 如果 AS 的作用大于 AT, 则表现出对 JH 合成的抑制, 否则则对 JH 的合成起促进作用。因此 AS、AT 在个体发育中的消长规律和生理作用有待进一步研究。

### 参 考 文 献 (References)

- [1] Woodhead A P, Stay B, Seidel S L *et al.* Primary structure of four allatostatins: Neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 5 997~6 001
- [2] Bendena W G, Garside C S, Yu C G *et al.* Allatostatins: Diversity in structure and function of an insect neuropeptide family. *Annals. N. Y. Acad. Sci.*, 1997, 814: 53~66
- [3] Kramer S J, Toschi A, Miller C A *et al.* Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 9 458~9 462
- [4] 毕富春. 粘虫的简易人工饲料及防腐剂对生长发育的影响. *昆虫知识*, 1983, 20 (6): 260~263
- [5] Feyereisen R, Tobe S S. A rapid partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. *Anal. Biochem.*, 1981, 111: 372~375
- [6] Tobe S S, Clark N. The effect of L-methionine concentration on juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the cockroach, *Diploptera punctata*. *Insect Biochem.*, 1985, 15: 175~179
- [7] Granger N A, Janzen W P. Inhibition of *Manduca sexta* corpora allata *in vitro* by a cerebral allatostatic neuropeptide. *Mol. Cell Endocrinol.*, 1987, 49: 237~248
- [8] Kataoka H, Toschi A, Li J P *et al.* Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science*, 1989, 243: 1 481

## Preliminary isolation and purification of allatostatin from *Mythimna separata*

OUYANG Ying-chun, TANG Shuang, GUAN Xue-chen, FANG Yu-ling

(State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology,  
the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract:** In this report, a preliminary isolation of AS from the brains of larvae, *Mythimna separata*, is described. The AS-activity material which can inhibit JH synthesis by CA occurs in the brains of last instar. The ability of brain extract to inhibit JH synthesis *in vitro* was tested by radiochemical assay. Using 1 brain equivalent, 51% inhibition of JH synthesis was achieved. If the brain extract was pretreated with trypsin, the inhibitory effect of the extract was greatly reduced. Assays of fractions from the reversal-phase C<sub>18</sub> column of HPLC separation showed that materials with AS activity were eluted between 5.2% to 28% methanol (fraction 1~20), and between 40% to 76% methanol (fraction 30~60). Assays of fractions 3, 5, 11, 40, 54 and 60 using 5 brain equivalents per pair of CA showed >50% inhibition of JH synthesis. Further purification of the fractions from the C<sub>18</sub> column with allatostatic activity is in progress.

**Key words:** *Mythimna separata*; allatostatin; brain extract; HPLC